AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 70, №2, səh. 107-112 (2015)

Использование Полиеновых Макролидных Антибиотиков В Сочетании С Диметилсульфоксидом При Вирусных И Грибковых Заболеваний Растений

В.Х. Гасымова

Бакинский государственный университет, ул. З. Халилова, 23, Баку AZ 1148, Азербайджан;
E-mail: vafahal@hotmail.com

В данной работе представлены сравнительные физико-химические характеристики диметилсульфоксида (ДМСО) и полиеновых антибиотиков (ПА), рассмотрены эффекты комплексного взаимодействия ДМСО и ПА с бимолеклярными липидными мембранами, изложены результаты экспериментальных исследований физико-химических характеристик амфотерицина В и леворина в мембранах. На основе ПА разработана теоретическая модель создания эффективных мембраноактивных препаратов против вирусных и грибковых заболеваний растений.

Ключевые слова: *Полиеновые макролидные антибиотики, диметилсульфоксид, амфотерицин В, леворин, липидные мембраны, вирусные и грибковые заболевания растений*

ВВЕДЕНИЕ

Защита растений от патогенных инфекций является одной из важнейших и экономически значимых проблем и требуется разработка методов интегрированной системы защиты растений с использованием безопасных, экологически чистых и экономически эффективных биологических средств нового поколения. Ведется интенсивный поиск биологически активных соединений, способных эффективно подавлять растительные инфекции. Однако до сих пор эффективных мер борьбы с вирусными и грибковыми инфекциями растений еще не найдено. Необходим новый подход для решения данной проблемы, где особая роль принадлежит почвенным микроорганизмам. Для получения биологически-активных соединений используются почвенные актиномицеты, способные синтезировать антибиотические вещества и подавлять развитие патогенных инфекций (Звягинцев и др., 1996; Bredholt et al., 2008). Почвенные грамм-положительные микроорганизмы, принадлежащие к классу *Streptomyces*, продуцируют большинство антибиотиков. Одним из способов сохранения чистоты экосистем является использование антибиотиков, обладающих специфичностью и избирательностью своего действия на патогенные микроорганизмы (Gray et al., 2012). Исследования в этом направлении предполагают использование антибиотиков, действующие на цитоплазматические мембраны растительных клеток. Используя почвенные актиномицеты, был получен новый класс полиеновых макролидных антибиотиков (Borowski, 2000; Caffrey et al., 2008). Основными представителями полиеновых антибиотиков (ПА) являются амфотерицин В, нистатин, микогептин и леворин. Молекулы ПА содержат в своем составе лактонное кольцо, сопряженную систему двойных связей и гидрофильную цепь, состоящую из гидроксильных и карбонильных групп.

Основная идея и общая концепция данной работы состоит в том, что, исследуя физико-химические свойства ПА выявить новые вещества, способные избирательно поражать вирусные и грибковые инфекции растений. ПА обладают высокой биологической активностью и специфичностью своего действия на клеточные и липидные мембраны (Ibragimova et al., 2006). Особенность ПА состоит в том, что это единственный в природе класс соединений, образующие в клеточных и липидных мембранах структурные каналы молекулярных размеров, избирательно проницаемые для ионов и органических соединений (Baginski et al., 2006, 2007; Ibragimova et al., 2006; Касумов, 2009; Baginski, Czub, 2009; Récamier et al., 2010; Cohen, 2010). В результате формирования каналов в мембране происходит утечка основных метаболитов, что приводит к лизису клеток. Расшифрована химическая структура ПА и разработаны пути модификации полиеновой молекулы (Borowski, 2000; Zotchev, 2008; Baginski, Czub, 2009). Исследования показали, что самыми эффективными антибиотиками являются амфотерицин В и леворин. Особая роль в формировании проводящих амфотерициновых и левориновых каналов внутри мембраны принадлежит диметилсульфоксиду (ДМСО). ДМСО обладает способностью резко усиливать биологическую активность ПА и индуцировать в мембранах избирательную проницаемость для ионов и органических соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПА хорошо растворяются в ДМСО. Полиены обладают амфотерными свойствами, ионизируясь, они образуют в кислой среде катион, а в щелочной – анион.

В комплексе с ДМСО полиены представляют собой жидкость темно-желтого цвета, горьковатого вкуса, со специфическим запахом. При приготовлении активной формы ПА необходимо сначала преобразовать антибиотическое вещество из порошкообразной формы (кристаллической) в молекулярную форму. При этом достигается перевод антибиотического вещества в наиболее эффективную форму, способную впоследствии активно смешиваться с гидрофильными соединениями. После тщательного перемешивания ПА с ДМСО состав выдерживается в течение суток при комнатной температуре. Затем жидкость фильтруется и хранится в темном, прохладном месте. В результате получается маточный раствор ПА, готовый к использованию. Применение ПА в таком сочетании компонентов является высокоэффективным. 1 литр маточного раствора ПА разбавляется в 50-100 литрах воды и этим раствором опрыскивается зараженная поверхность овощных и других видов сельскохозяйственных культур и обрабатывается их корневая система.

Биологическая активность ПА определяется методом бислойных липидных мембран (БЛМ) (Ibragimova et al., 2006). БЛМ получали из общих фосфолипидов, выделенных из клеток, путем нанесения капли фосфолипидов на отверстие в тефлоновой ячейке. Общие фосфолипиды очищали от холестерина и других нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0^{o}С при концентрации 20 мг/мл в хлороформ-метанольном растворе в объемном соотношении (2:1). Изучалась интегральная проводимость мембран в зависимости от концентрации антибиотика (Ibragimova et al., 2006). При определенной концентрации антибиотика достигается максимальная проводимость мембран, которая берется в качестве активной составляющей ПА. Основные сведения о механизме функционирования ПА в мембранах были получены с помощью метода БЛМ.

Метод основан на способности ПА резко повышать проницаемость липидных мембран для соответствующих ионов путем регистрации изменения электрической проводимости мембран. Исследования интегральной проводимости и измерение мембранного потенциала проводилось в режиме фиксации потенциала и тока с помощью электрометрического усилителя постоянного тока Keithley-301 (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диметилсульфоксид $(CH_3)_2SO$ впервые был получен А.М. Зайцевым и является первым членом гомологического ряда сульфоксидов R_2SO. Он представляет собой прозрачную, бесцветную, слегка горькую на вкус жидкость, со специфическим запахом, хорошо растворяется в воде (Yu, Quinn, 1994). На основании структурных исследований и данных по межатомным расстояниям сделан вывод о наличии двойной связи S=O в сульфоксидах. Молекула ДМСО амфифильна и высокополярна. Отрицательный полюс диполя находится на атоме кислорода. ДМСО обладает упорядоченной структурой, которая разрушается в интервале температур 40-60^{o}C, что вытекает из температурной зависимости показателя рефракции, плотности, вязкости и других характеристик. Его ассоциаты легко разрушаются при добавлении веществ, являющимися донорами протонов. ДМСО обладает дипольным моментом и, благодаря диполь-дипольному взаимодействию, молекулы ДМСО ориентируются друг относительно друга, образуя полимерную цепочку, обусловленную кислородными связями. При смешивании ДМСО с водой происходит эндотермическая реакция, при которой температура воды повышается на 30^{0}С. Этот эффект указывает на формирование водородных связей между молекулами ДМСО и воды (Vaisman, Berkowitz, 1992).

Исследования молекулярного механизма взаимодействия ПА с мембранами показали, что полиены создают в мембранах каналы, через которые из клеток в наружную среду могут диффундировать ионы и внутриклеточные компоненты, приводящие к лизису клеток (Cohen, 2010). Фунгицидный эффект ПА объясняется выходом из клеток ионов K^{+} и Na^{+} через сформировавшиеся ионные каналы.

Наличие определенного числа двойных связей в хромофоре ПА является важным фактором, определяющим их чувствительность к мембранам. Наблюдается прямая зависимость между числом двойных связей в хромофоре и биологической активностью антибиотиков (Joly et al., 1992).

Было показано, что леворин обладает более высокой избирательностью действия на мембраны и отличается от других ПА повышенной растворимостью в воде (Ибрагимова и др. 2006). Молекулы ДМСО обладают высокой степенью резорбции благодаря тому, что величина диэлектрической проницаемости ДМСО находится между водой и жирами. Это свидетельствует о том, что ДМСО усиливает проницаемость большого числа лекарственных соединений че-

рез биологические мембраны, а также способствует достаточно глубокому их проникновению внутрь клетки.

Впервые были изучены физико-химические свойства амфотерицина В и леворина в комплексе с ДМСО и их смешанные растворы в различных соотношениях. Исследована зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина. Амфотерицин В резко увеличивает проницаемость мембран для ионов, воды, неэлектролитов и органических соединений. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В растет пропорционально 8-10-ой степени и эта степень зависит от структуры молекул ПА. При увеличении концентрации ДМСО в водном растворе увеличивается эффективность сборки полиеновых каналов и усиливается стабильность работы канала в проводящем состоянии. Амфотерицин В при концентрации $1\cdot10^{-6}$ М в 10^5-10^6 раз понижает исходное удельное сопротивление мембран (1-$5\cdot10^{-8}$ Ом·см^2), приготовленных из общих фосфолипидов. На рис. 1. показана зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В при различных концентрациях холестерина в мембранах, кривые 1 и 2.

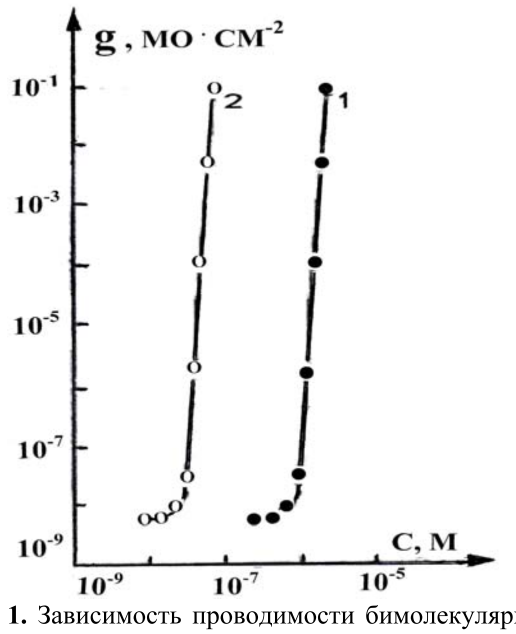


Рис. 1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 20:1, кривая 2 – 2:1. Мембраны образовывались в растворе 10 мМ KCl, pH=6.5, t=22ºC.

Добавка холестерина к фосфолипидам увеличивает эффективность действия антибиотика. Мембраны в присутствии амфотерицина В избирательно проницаемы для одновалентных анионов. Однако, при исследовании ароматических антибиотиков было обнаружено, что в отличие от амфотерицина В, леворин вызывает избирательную проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов. Этот антибиотик отличается от нистатина, амфотерицина В и микогептина наличием в молекулах дополнительной ароматической группировки–ρ-аминоацетофенона, в которой содержится положительно заряженный азот.

На рис. 2 приведены зависимости проводимости мембран от концентрации леворина. Увеличение концентрации холестерина в мембране повышает эффективность леворина, рис. 2, кривые 1 и 2. При увеличении концентрации антибиотика проводимость мембран растет пропорционально 4-ой степени концентрации леворина. Исследования зависимости проводимости мембран от концентрации леворина привели к предположению о наличии в мембранах каналов молекулярных размеров, индуцирующих ионную проницаемость. Можно думать, что избирательная проницаемость для катионов связана с образованием в мембранах отрицательно заряженных пор. Скорее, перенос катионов через границу мембраны осуществляется через гидрофильные части канала. Существенную информацию о механизме проницаемости мембран в присутствии ароматических антибиотиков можно извлечь из данных о переносе через мембрану малых ионов, таких как гуанидин и гидразин. В присутствии леворина эти ионы проникают через мембрану значительно лучше, чем ионы K^+ и Na^+. Наличие определенного числа двойных связей в хромофоре амфотерицина В и леворина является важным фактором, определяющим их чувствительность к мембранам.

Результаты проведенных экспериментов дают основание предположить, что механизм избирательного действия основан на специфическом взаимодействии молекул антибиотиков с мембранами. Проведенные исследования показали, что хромофоры молекул ПА, взаимодействуя с фосфолипидами, формируют канал в стехиометрическом соотношении 1:1. Стехиометрический коэффициент сборки одиночных каналов для разных ПА может сильно отличаться друг от друга и быть равным от 3 до 17. Следует отметить, что молекулярная структура гидрофильной части канала до сих пор не установлена из-за отсутствия соответствующих методов определения точной локализации молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость канала. Согласно проведенным исследованиям, внутренний диаметр канала составляет величину 7-10 Å (Baginski et al., 1994, 1997; Ибрагимова и др., 2006).

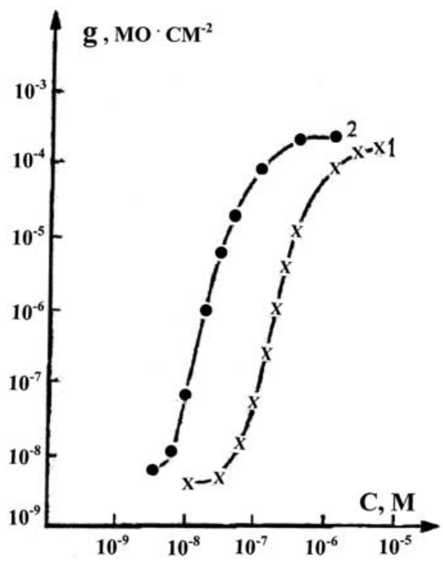


Рис. 2. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации леворина, кривые 1 и 2, в растворах 10 мМ KCl, pH=6.5, t=22°C. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 20:1, а кривая 2 в весовом соотношении 2:1.

Компьютерной анализ показал, что при формировании ионного канала в присутствии амидного производного амфотерицина В ионизирующие группы молекул могут быть обращены как внутрь, так и вне канала, т.е. полярные группы могут быть в двух конформационных формах, благодаря повороту микозамина вокруг гликозидной связи (Resat et al., 2000). Существует предположение о том, что встраивание антибиотиков в мембрану происходит в результате образования водородной связи между ПА и фосфатными группами молекул фосфолипидов.

Быстрое проникновение антибиотиков в растение и распространение его в тканях при сравнительно медленной инактивации биологической активности позволяет создавать определенное насыщение антибиотиком, необходимое для подавления фитопатогенной микрофлоры. Биологическая активность антибиотиков проявляется в тканях растений значительно сильнее, чем в тканях животных.

Исходя из этих данных, была создана теоретическая модель синтеза новых ПА с установленной биологической активностью. Согласно этой модели был разработан новый препарат, который обладает способностью подавлять вирусные и грибковые инфекции овощных культур. Проведенные исследования в данном направлении позволили выявить из группы ароматических ПА новое соединение Инфанвир, которое обладает способностью эффективно и избирательно подавлять вирусные и грибковые инфекции.

На базе нескольких фирм, расположенных на Апшеронском полуострове в пос. Мардакан, проведены эксперименты в тепличных помещениях, а также в открытых грунтах. На опытных участках выращивались огурцы, помидоры, баклажаны и перец. Обработка растений, а также почвы, пораженных вирусной и грибковой инфекцией, путем опрыскивания зараженных участков раствором Инфанвир приводит к уничтожению вирусных и грибковых инфекций. Обнаружено, что препарат Инфанвир обладает способностью полностью подавлять рост вируса табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*) (Ибрагимова и др., 2012). В результате лабораторных исследований образца почвы, на которой выращивали овощные культуры, было установлено, что в данной почве содержатся следующие минеральные вещества: небольшое количество азота, высокое количество фосфора и малое количество калия, pH образца почвы слабо щелочная. В таб. 1 приведены данные состава почвы по минеральным элементам на основе почвенной градации. Несмотря на недостающие минеральные элементы в почве, где выращивались овощные культуры, проведенные исследования показали высокую эффективность действия препарата.

Таблица 1. Состав почвы по минеральным элементам на основе почвенной градации.

Название образца	pH	Степень обеспечения почвы минеральными элементами на основе почвенной градации			EC соленость (мС)	NaCl (ппм) норма 150-300	KCl (ппм) норма 350-700
Почва		Азот 40-120 мг/кг	Фосфор 15-60 мг/кг	Калий 300-600 мг/кг			
		Показатель обеспечения минеральными элементами образца					
		Азот N/NH_3 мг/кг	Фосфор P_2O_5 мг/кг	Калий K_2O мг/кг			
	7,55	7,76	133,32	212,08	1,18	520	516

Инфанвир содержит в своем составе активный компонент, что позволяет использовать его при лечении вирусных и грибковых заболеваний овощных культур (состав инфанвира не приводится из-за патентных соображений). Предполагается, что Инфанвир, формирующий молекулярный комплекс, при взаимодействии с цитоплазматическими мембранами способствует подавлению вирусных и грибковых инфекций овощных и других видов сельскохозяйственных культур. Антивирусный и противогрибковый эффект инфанвира проявляется за счет связывания антибиотика с мембранами с последующим формированием в них комплекса, ко-

торое представляет собой канальное образование молекулярных размеров, что выражается в ингибирующем влиянии препарата на репродукцию вирусов и грибковых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. и др. (1996) Разнообразие грибов и актиномицетов и их экологические функции. *Почвоведение,* **№6:** 705.

Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. (2006) Эффект макролидного гептаенового антибиотика леворина A_2, вводимого с одной стороны мембраны. *Биологические мембраны,* **23(№6):** 493-502.

Ибрагимова В.Х., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. (2012) Антивирусное и антигрибковое действие антибиотика инфанвир при заболевании овощных культур. *Известия НАНА, серия биол. наук,* **67(№2):** 34-37.

Касумов Х.М. (2009) Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 1-512.

Baginski M., Cybulska B., Gruszecki W.I. (2006) Chapter 9: Interaction of polyene macrolide antibiotics with lipid model membranes. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes,* **3:** 269-329.

Baginski M., Czub J., Sternal K. (2007) Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. *Chem. Res.,* **6:** 320-332.

Baginski M., Gariboldi P., Bruni P., Borowski E. (1994) Conformational analyses of amphotericin. *Biophys. Chem.,* **49:** 241-250.

Baginski M., Resat H., McCammon J. (1997) Molecular properties of amphotericin B membrane channel: molecular dynamics simulation. *Mol. Pharmacol.,* **52:** 560-570.

Baginski M., Czub J. (2009) Amphotericin B and ıts new derivatives - mode of action. *Current Drug Metabolism,* **10:** 459-469.

Borowski E. (2000) Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco,* **55:** 206-208.

Bredholt H., Fjaervik E., Johnsen G. et al. (2008) Actinomycetes from sediments in the *Trondheim fjord*, Norway: diversity and biological activity. *Mar. Drugs.,* **6:** 12-24.

Caffrey P. Aparicio J.F., Malpartida F., Zotchev S.B. (2008) Biosynthetic engineering of polyene macrolides: Towards generation of ımproved antifungal and antiparasitic agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry,* **8:** 639-653.

Cohen B.E. (2010) Amphotericin B Membrane Action: Role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J. Membrane Biol.,* **238:** 1–20.

Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I. et al. (2012) Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **109:** 2234-2239.

Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh., Khutorsky V. (2006) Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta,* **1758:** 29-37.

Joly V., Bolard J., Yeni P. (1992) *In vitro* models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **36(9):** 1799-1804.

Récamier K.S., Hernández-Gómez A., González-Damián J. et al. (2010) Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. *Journal of Membrane Biology,* **237(1):** 31-40.

Resat H., Sungur F.A., Baginski M., Borowski E. (2000) Aviyente V. Conformational properties of amphotericin B amide derivatives-impact on selective toxicity. *J. Comput. Aided. Mol. Des.,* **14:** 689-703.

Vaisman I., Berkowitz M. (1992) Local structural order and molecular associations in water-DMSO mixtures. *Molecular dynamics study. J. Am. Chem. Soc.,* **114:** 7889-7896.

Yu Z., Quinn P. (1994) Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Bioscience Reports,* **14:** 259-281.

Zotchev S.B. (2008) Biosynthesis of natural products applied to drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.,* **8:** 616-617.

Polien Makrolid Antibiotiklərin Dimetilsulfoksidlə Birgə Bitkilərin Virus Və Göbələk Xəstəliklərinə Qarşı İstifadəsi

V.X. Qasımova

Bakı Dövlət Universiteti

Polien antibiotiklərin (PA) və dimetilsulfoksid (DMSO) molekulların fiziki-kimyəvi xüsusiyyətləri məqalədə müqaisəli şəkildə göstərilmişdir. Onların bimolekulyar lipid membranları ilə kompleks şəklində qarşılıqlı təsiri ilə bağlı və membranlarda yaratdıqı bioloji effektlərin qiymətləndirilməsinə yönəlmiş tədqiqat işləri aparılmışdır. Amfoterisin B və levorin molekulların membranlarla qarşılıqlı təsiri və fiziki-kimyəvi xüsusiyyətlərinin eksperimental tədqiqi məqalədə şərh edilmişdir. PA-in əsasında bitkilərin virus və göbələk xəstəliklərinə qarşı effektiv təsir göstərən membranaktiv preparatların yaradılmasına aid nəzəri model hazırlanmışdır.

Açar sözlər: *Polien makrolid antibiotiklər, dimetilsulfoksid, amfoterisinB, levorin, lipid membranları, bitkilərin virus və qöbələk xəstəklərinə tutulması.*

Use of Polyene Macrolide Antibiotics In Combination With Dimethil Sulfoxide As Antiviral And Antifungal Agent At Plant Treatment

V.Kh. Gasimova

Baku State University

Comparative physical and chemical characteristics of dimethyl sulfoxide (DMSO) and polyene antibiotics (PA) have been presented in this paper. The effect of a complex interaction of DMSO and PA with bilayer lipid membranes was examined and the results of experimental studies of physical and chemical characteristics of amphotericin B and levorin molecules and the interaction with the membranes were discussed. On the basis of PA molecules a theoretical model of creating effective membrane-active preparation against viral and fungal diseases of plants was developed.

Keywords: *Polyene macrolide antibiotiks, dimethyl sulfoxide, amphotericib B, levorin, lipid membranes, viral and funqal diseases of plants.*